

Omar Kaoudahhan

Optimiziranje metode za određivanje koncentracije vinske kiseline u voćnim sokovima

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Stanična biologija s genetikom Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmaceutsku botaniku, pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Ana-Marije Domijan.

Srdačno se zahvaljujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Ana-Mariji Domijan, na pruženoj pomoći, strpljenju i preporukama prilikom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem svim djelatnicima Zavoda za analitičku kemiju na potpori te na korištenju sredstava i potrebne laboratorijske opreme Zavoda.

SADRŽAJ

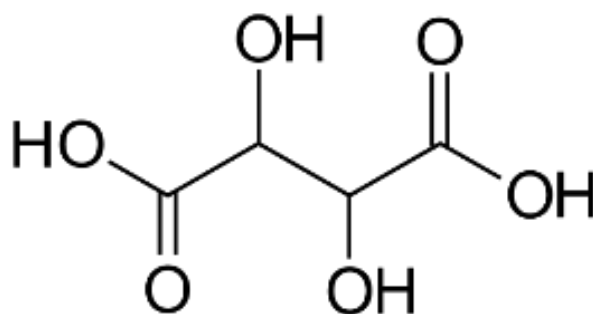
1. UVOD	1
1.1. Vinska kiselina	2
1.1.2. Upotreba vinske kiseline.....	4
1.1.3. Povezanost vinske kiseline s ljudskim zdravljem	5
1.2. Kromatografske metode odjeljivanja.....	6
1.2.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti – HPLC.....	6
1.2.2. Osnovni dijelovi HPLC-a	8
1.3. Validacija metode	10
1.3.1. Granica dokazivanja.....	10
1.3.2. Granica određivanja	11
1.3.3. Točnost.....	11
1.3.4. Preciznost	12
1.3.5. Specifičnost i selektivnost.....	12
1.3.6. Linearnost i područje mjerenja	12
1.3.7. Otpornost.....	13
2. OBRAZLOŽENJE TEME	14
3. MATERIJALI I METODE	16
3.1. Kemikalije	17
3.1.1. Korištene kemikalije:	17
3.2. Aparatura	17
3.2.1. Upotrebljena aparatura:.....	17
3.2.2. Dijelovi korištenog HPLC-a:	17
3.2.3. Uvjeti na HPLC-u	17
3.3. Uzorci	18
3.4. Određivanje koncentracije vinske kiseline pomoću HPLC-a.....	18
3.4.1. Priprema otopina	18
3.4.2. Priprema uzoraka	20
4. REZULTATI I RASPRAVA	21
4.1. Uvođenje metode za određivanje vinske kiseline na HPLC s UV/Vis detektorom	22
4.2. Validacija metode za određivanje vinske kiseline na HPLC s UV/Vis detektorom.....	24
4.2.1. Linearnost	25
4.2.2. Preciznost	26

4.2.3. Granica dokazivanja i granica određivanja	27
4.3. Ispitivanje HPLC-UV/Vis metode za određivanje vinske kiseline na uzorcima voćnih sokova	28
5. ZAKLJUČCI	31
6. LITERATURA	33
7. SAŽETAK/SUMMARY	36
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

1.1. Vinska kiselina

Vinska kiselina bijela je slaba kristalna diprotonska organska kiselina. Naziv po Međunarodnoj uniji za čistu i primijenjenu kemiju, IUPAC, je 2,3-dihidroksibutandionska kiselina. Predstavlja dihidroksilni derivat jantarne kiseline. Molekulska formula vinske kiseline je $C_4H_6O_6$. Vinska kiselina ima malu molarnu masu ($M=150,09$ g/mol). Kemijska struktura vinske kiseline prikazana je na slici 1. Vinska kiselina dobro je topiva u vodi i ugodnog je kiselog okusa. Soli vinske kiseline nazivaju se tartarati (Izvor: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)



Slika 1. Kemijska struktura vinske kiseline (Izvor: [https:// www.softschools.com](https://www.softschools.com))

Vinska kiselina jedna je od najraširenijih biljnih kiselina. Prirodno se javlja u mnogim biljkama, a njezina kalijeva sol nalazi se u soku grožđa, bananama i tamarindu. Vinsku kiselinu oko 800. godine iz kalijevog tartarata izolirao je perzijski alkemičar Jabir Ibn Hayyan. Pod nazivom tartarat bila je poznata i u antičko vrijeme. Prvi puta modernim procesom vinsku je kiselinu izolirao 1769. godine švedski kemičar Carl Wilhelm Scheele (Noller, 1973).

Scheele je 1769. godine izolirao vinsku kiselinu iz vinskog kamena. Vinski kamen (drugi nazivi: birsa, striž) je kristalna naslaga koja se zbog slabe topljivosti taloži nakon vrenja na stjenkama posuda u kojima se drži vino (vinske bačve) (Izvor: <http://www.enciklopedija.hr>).

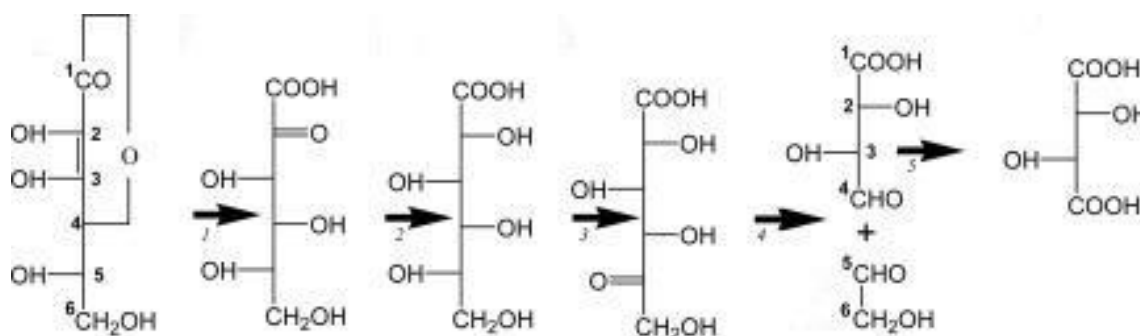
Vinski kamen, $KC_4H_5O_6$, je dakle sol vinske kiseline, kalijev hidrogentartarat te se sastoji od sirova kalijeva bitartarata i kalcijeva tartarata. Vinski kamen sadrži dvije izomerne kiseline od kojih je jedna upravo vinska kiselina koju je prvi put izolirao Scheele 1769. godine, a druga je izomerno optički inaktivna kiselina koja je nazvana racemičnom kiselinom

jer sadrži jednake količine dvaju različitih vrsta molekula, desnoskrećuće i lijevoskrećuće (Noller, 1973).



Slika 2. Grožđe: primjer namirnice bogate vinskom kiselinom (Izvor: <https://agroekonomija.wordpress.com>)

Grožđe (slika 2) tijekom zrenja akumulira vinsku kiselinu koja ostaje unutar grožđa. Istraživanjima je utvrđeno da pojedine vrste grožđa prirodnim putem sintetiziraju vinsku kiselinu direktno iz vitamina C (L-askorbinske kiseline) (slika 3; DeBolt i sur., 2006). Također je dokazano i postojanje drugih vrsta grožđa kojima nedostaje gen za pretvorbu vitamina C u vinsku kiselinu, što posljedično dovodi do visokih razina vitamina C, a manjka vinske kiseline u tim vrstama. Dakle, modulacijom biosinteze vinske kiseline u pojedinim vrstama grožđa može se proizvoditi grožđe bogato vitaminom C (DeBolt i sur., 2006). Okus grožđa, organoleptička svojstva i potencijal starenja vina su povezani upravo s količinom vinske kiseline.



Slika 3. Pretpostavljeni put nastanka vinske kiseline iz vitamina C (Izvor: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Vinska kiselina jedna je od glavnih kiselina pronađenih u vinu. Prilikom izrade vina na niskim temperaturama se prirodno talože kalijeve i kalcijeve soli vinske kiseline odnosno vinski kamen. Taj proces je poželjan jer se na taj način djelomično smanjuje višak ukupne

kiseline u vinu. Osim vinske kiseline u vinima su prisutne jabučna i limunska kiselina te se one ubrajaju u nehlapljive kiseline, a također su u vinima prisutne i hlapljive kiseline poput octene kiseline. Vina mogu sadržavati previše kiselina pa se trebaju otkiseliti, a isto tako mogu sadržavati i premalu količinu kiselina pa se mogu dodati kiseline poput vinske kiseline (Izvor: <http://www.vinogradarstvo.com>).

1.1.2. Upotreba vinske kiseline

Vinska kiselina ima široku primjenu u kemijskoj, farmaceutskoj, prehrambenoj i industriji vina.

Reakcijom neutralizacije kalijeva tartarata s natrijevim hidroksidom nastaje natrij-kalijev tartarat koji služi za dobivanje Fehlingove otopine. Fehlingova otopina, koja se koristi kao blago sredstvo za oksidaciju aldehida u kemijskoj industriji, izrađuje se pomoću bakrenog sulfata, natrijeva hidroksida i natrij-kalijeva tartarata (Noller, 1973). Vinska kiselina koristi se i prilikom izrade žbuke, gipsanih ploča i fasada kao sredstvo koje kontrolira brzinu sušenja. Pored toga koristi se kao gnojivo i za bojenje tekstila (Izvor: <http://www.enciklopedija.hr>).

Već spomenuti natrij-kalijev tartarat koji je poznat kao Seignettova sol (Rochelle-sol) koristi se kao purgativ (Noller, 1973).

U farmaceutskoj industriji vinska kiselina se koristi kao kisela pomoćna tvar i antioksidans. Kao pomoćna tvar koristi se pri izradi efervescentnih tableta. Također se koristi kao međuprodukt u proizvodnji etambutola. Kao antioksidans se primjenjuje u kozmetici u serumu za lice jer poboljšava metabolizam kože (Izvor: <http://www.foodchemadditives.com>).

U prehrambenoj industriji vinska kiselina se koristi za regulaciju kiselosti i kao antioksidans. Njena upotreba dopuštena je i u ekološkoj proizvodnji te se smatra bezopasnom i ima oznaku E334. U pekarstvu se koristi kao kisela komponenta za praške za pecivo, a prilikom miješanja vinske kiseline sa sodom bikarbonom nastaje ugljični dioksid koji poboljšava dizanje tijesta. Veliku važnost ima u industriji vina i pjenušaca gdje se koristi za spuštanje pH vrijednosti prilikom fermentacije što sprečava razvoj nepoželjnih bakterija, a nakon fermentacije djeluje kao konzervans, a naravno i na organoleptička svojstva vina (Naqvi, 2017; Melino i sur., 2009). Također se koristi kao antioksidans/konzervans i u voćnim sokovima.

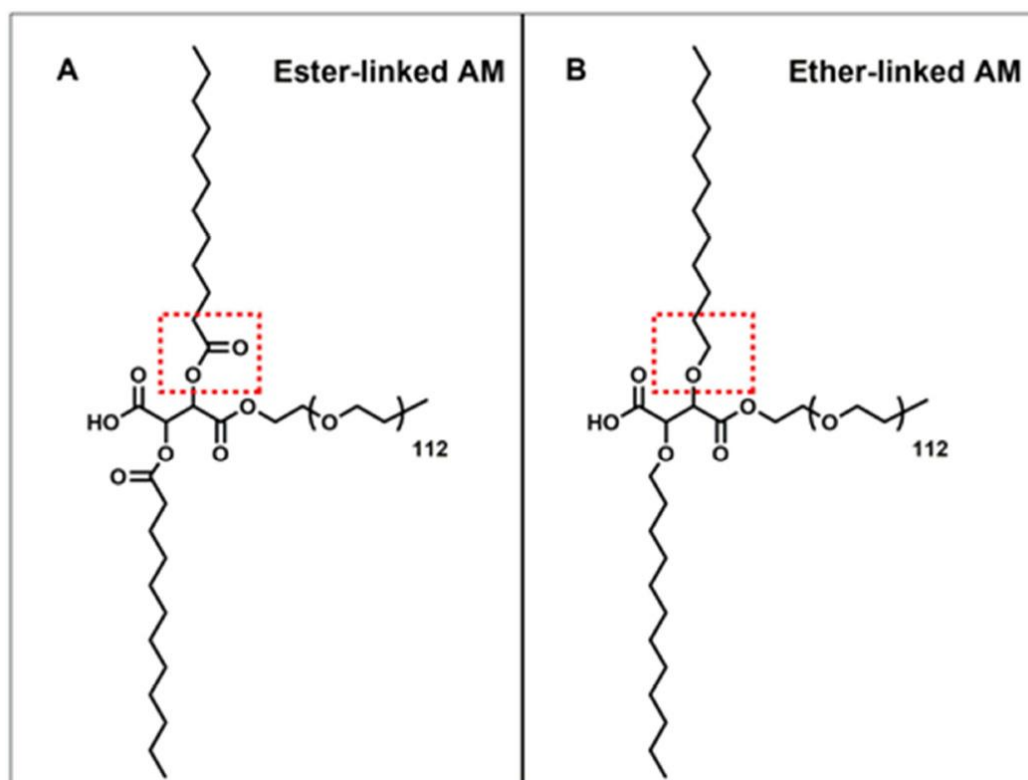
1.1.3. Povezanost vinske kiseline s ljudskim zdravljem

Nakon unosa u organizam, 80% vinske kiseline razgrade crijevne bakterije, a preostala količina se apsorbira u krv. Višak vinske kiseline izlučuje se urinom.

Istraživanjima se pokazalo da izloženost visokim dozama vinske kiseline može dovesti do akutnog oštećenja bubrega, gastrointestinalnih tegoba te kardiovaskularnog kolapsa. Vinska kiselina djeluje kao laksativ te posljedično može dovesti do gubitka tekućine iz gastrointestinalnog trakta (Rusyniak i sur., 2012). Istraživanje koje je provedeno u Pakistanu pokazalo je da od 4 pacijenta koja su se otrovala s vinskom kiselinom (u pokušaju samoubojstva) vinska je kiselina u dva pacijenta uzrokovala akutnu nekrozu tubula (Naqvi, 2017).

Postoje dokazi da učestala izloženost vinskoj kiselini također može dovesti do erozije zuba (Elsbury i sur., 1951).

S druge strane, vinska kiselina može imati povoljno farmakološko djelovanje kada se nalazi u obliku estera ili etera (slika 4). Vinska kiselina esterificirana s različitim hidrofobnim lancima može imati značajan učinak na antiaterogeno djelovanje jer sprječava nakupljanje oksidiranog LDL-a, kao i eteri vinske kiseline koji pokazuju još veći učinak na smanjenje kardiovaskularne bolesti. Eteri su također prihvatljiviji za dizajniranje zbog manje osjetljivosti na enzimsku hidrolizu u odnosu na esterske molekule (Abdelhamid i sur., 2015).



Slika 4. Ester i eter vinske kiseline (Izvor: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

1.2. Kromatografske metode odjeljivanja

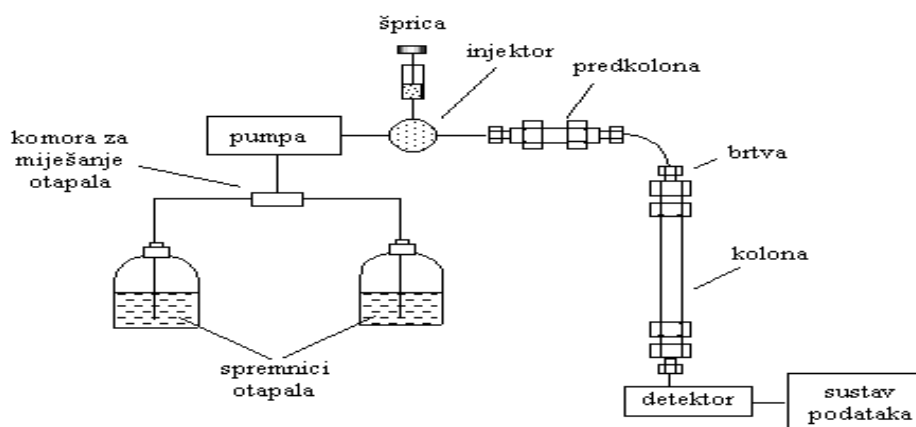
Kromatografske metode odjeljivanja služe za odjeljivanje, identifikaciju i kvantitativno određivanje kemijskih sastojaka koji su prisutni u smjesama tvari. Danas su široko primjenjive zbog svojih karakteristika i mogućnosti te se smatraju najmoćnijim tehnikama kemijske analize. Kod kromatografskih metoda prisutne su stacionarna i mobilna faza pri čemu plinovita ili tekuća mobilna faza nosi sastavnice uzorka kroz stacionarnu fazu. Pri tome se odjeljivanje temelji na njihovim različitim brzinama kretanja kroz stacionarnu fazu zbog različitog stupnja interakcije s česticama stacionarne faze. Sve kromatografske metode se temelje na uspostavi ravnoteže između stacionarne i mobilne faze. Kao mobilna faza koristi se tekućina, plin i superkritična tekućina, a kao stacionarna faza koristi se krutina, tekućina nanosena na krutinu ili gel. Kromatografske metode odjeljivanja dijele se na dvije vrste, a to su kromatografija na koloni i plošna kromatografija. Kod kromatografije na koloni, stacionarna faza ispunjava usku cijev kroz koju se mobilna faza kreće pod utjecajem tlaka ili gravitacije. Kod plošne kromatografije, stacionarna faza je nanosena na ravnu plohu kroz koju se mobilna faza kreće pod utjecajem kapilarnih sila ili gravitacije (Skoog i sur., 1999; Christian, 2004).

1.2.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti – HPLC

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) je najkorištenija tekućinska kromatografija. Koristi se za odjeljivanje i određivanje sastojaka u organskom, anorganskom i biološkom materijalu. U tekućinskoj kromatografiji mobilna faza je tekuće otapalo najčešće sastavljeno od smjese otopina. Ovisno o mehanizmu odjeljivanja i vrsti stacionarne faze tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti se dijeli na više vrsta, a to su razdjelna, adsorpcijska, ionska izmjena, raspodjela prema veličini čestica, afinitetna i kiralna kromatografija. Načelo metode sastoji se u tome da tekuća mobilna faza pod visokim tlakom prolazi kroz kolonu ispunjenu česticama stacionarne faze (veličine 3-10 μm) noseći sa sobom sastavnice uzorka koje će se zadržavati na stacionarnoj fazi ovisno o vrsti uzorka, stacionarnoj fazi i mobilnoj fazi. Da bi se postigle optimalne brzine protoka u kolonama ispunjenima sitnim česticama stacionarne faze, potrebni su visoki tlakovi od nekoliko milijuna Pa. Takvi tlakovi zahtijevaju skuplju i kompleksniju opremu od opreme drugih vrsta kromatografije (Skoog i sur., 2004).

Razdjelna tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti se može podijeliti na dvije vrste ovisno o polarnosti mobilne i stacionarne faze. To su normalno fazna i obrnuto fazna kromatografija. Kod normalno fazne kromatografije stacionarna faza je polarna (silikagel na koji mogu biti vezane polarne skupine poput diola, cijano ili amino), a mobilna faza je nepolarna (heksan, izopropanol). Kod obrnuto fazne kromatografije stacionarna faza je nepolarna (kemijski modificirana površina silikagela nastala silaniziranjem), a mobilna faza je polarna (voda, metanol, acetonitril). U normalno faznoj kromatografiji će se prvo eluirati nepolarni spojevi, a kasnije polarniji, dok će u obrnuto faznoj kromatografiji biti obratno. Također se razlikuje izokratna od gradijentne elucije ovisno o sastavu mobilne faze tijekom elucije. U izokratnoj eluciji se ne mijenja sastav mobilne faze, dok se u gradijentnoj eluciji mijenja sastav mobilne faze što utječe na brže i bolje odjeljivanje (Skoog i sur., 1999; Luterotti, 2012).

Kao mobilna faza koriste se otapala koja trebaju biti visoke čistoće i potrebno im je ukloniti otopljene plinove. Zatim se pomoću crpke unosi mobilna faza pod visokim tlakom (do 15 MPa) stalnom brzinom (0,1-10 mL/min) u kolonu. Uzorak se unosi mikrolitarskom špricom u petlju u kojoj se održava tlak. Nakon toga prebacivanjem ventila otapalo prolazi kroz petlju i sa sobom nosi uzorak na kolonu. Ispred kolone se nalazi kratka predkolona koja ima ulogu da sačuva kolonu od onečišćenja iz uzorka. Nakon toga se u koloni komponente uzorka razdvajaju te dolaze razdvojene do detektora. Zapis analitičkog signala u funkciji vremena ili volumena eluata zove se kromatogram. Signal detektora se pojavljuje kao odmak od bazne linije, a intenzitet tog signala je proporcionalan koncentraciji komponente te se ona može izračunati iz površine ili visine signala (Luterotti, 2012; Wessley i Zech, 1979).



Slika 5. Shematski prikaz HPLC kromatografa (Izvor: Luterotti, 2002)

Osnovni dijelovi HPLC-a su: spremnici za otapala mobilne faze, pumpa, injektor, predkolona, kolona, detektor i računalo (slika 5).

1.2.2. Osnovni dijelovi HPLC-a

- **Spremnici za otapala mobilne faze**

Uređaj za HPLC sastoji se od jednog ili više staklenih odnosno čeličnih spremnika za otapalo mobilne faze, volumena 500 mL ili više. Obično spremnici uključuju opremu koja uklanja plinove koji bi mogli uzrokovati širenje pikova i otežati detekciju, a također uklanja i onečišćenja koja mogu poremetiti rad detekora. Uklanjanje plinova odnosno otplinjavanje je postupak kojime se otopljeni plinovi uklanjaju iz otapala nošeni mjehurićima inertnog, netopljivog plina (Skoog i sur., 1999).

- **Pumpa**

Pumpe u tekućinskom kromatografu trebaju ispunjavati više uvjeta, a to su: visoki tlakovi od 40 milijuna Pa, izlaz bez pulsiranja tlaka, brzine protoka mobilne faze od 0,1-10 mL/min, reproducibilnost protoka mobilne faze od 99,5 % ili više i otpornost na koroziju izazvanu različitim otapalima. Koriste se dvije vrste mehaničkih pumpi: pumpa s vijčanim pogonom i recipročna pumpa. Pumpa s vijčanim pogonom stvara ravnomjeran protok mobilne faze koji se lako može nadzirati, ali nedostatak im je mali kapacitet i neprikladnost za promjenu otapala mobilne faze. Za razliku od njih recipročne pumpe, koje se sastoje od komore koja se puni i prazni pomicanjem klipa naprijed-natrag, koriste se češće. Kod recipročnih pumpi prednosti su visok vanjski tlak (do 70 milijuna Pa), mogućnost primjene za gradijentnu eluciju, mali unutarnji volumen, stalni protoci mobilne faze koji ne ovise ni o povratnom tlaku u koloni ni o viskoznosti otapala (Skoog i sur., 1999).

- **Injektor**

Injektor odnosno uređaj za unošenje uzoraka je važan dio HPLC-a i o injeciranju znatno ovisi uspješnost kromatografskog procesa. Uzorak se u kolonu najčešće unosi putem plinskog ventila uz kojega se nalazi više izmjenjivih petlji kojima se unose uzorci količine od 5 do 500 μ L. Kod takvog sustava nema prekida protoka mobilne faze, a posebna cjevčica fiksnog volumena napuni se otopinom

uzorka u fazi injiciranja i zatim prebacivanjem ventila mobilna faza ispere i odnese uzorak na kolonu. Postoje također i tehnika kod koje se prije injiciranja zaustavi mobilna faza, a nakon unošenja uzorka se ponovno uspostavi protok mobilne faze. Zbog prekida u protoku mobilne faze koji utječu na stabilnost bazne linije ova tehnika je neprikladna. Najpoželjniji su automatski injektori koji pojednostavljaju rukovanje cijelim sustavom te smanjuju mogućnost pogreške koja nastaje ručnim injiciranjem (Skoog i sur.,1999, Štraus i sur., 1997).

- **Kolona**

Kromatografska kolona služi za razdvajanje komponenti uzroka, a najčešće je izrađena od čeličnih ili staklenih cijevi. Materijali od kojih su napravljene kolone moraju biti stabilni u različitim otapalima koja se koriste kao mobilna faza. Kolone su najčešće duge 10-30 cm, unutrašnjeg promjera 4-10 mm s promjerom zrna punila 5-10 μm . Danas se uglavnom koriste djelotvorne mikrokolone duge 3-7,5 cm, unutrašnjeg promjera 1-4,6 mm s promjerom zrna punila 3-5 μm koje imaju prednost s obzirom na brzinu i potrošnju otapala.

Danas je na tržištu prisutno mnogo različitih punila, odnosno nosača stacionarne faze, ali u upotrebi je najčešće mikroporozni silikagel na čije se površinske silanolske skupine kemijski vežu različiti alifatski lanci sa ili bez funkcionalnih skupina. Tako se dobivaju punila različitog stupnja polarnosti, od potpuno nepolarnih stacionarnih faza do ionskih izmjenjivača. Druga punila koja su također u primjeni su molekulska sita, celuloza i aktivni ugljen. Temeljni uvjet za punila je mehanička otpornost na pritiske kojima su izložena protokom mobilne faze.

Također se pojavljuju i kapilarne kolone gdje je stacionarna faza nanescena na stijenke kolone, a njihova glavna prednost je značajna ušteda mobilne faze u odnosu na standardne analitičke kolone.

Uz kolonu se također može vezati i sistem za kontrolu temperature zbog značajnog utjecaja temperature na vremena zadržavanja i razlučivost pojedinih tvari. Povišenjem temperature skraćuju se vremena zadržavanja, a zbog suženja pikova povećava se i efikasnost kolone (Skoog i sur.,1999, Štraus i sur., 1997).

- **Detektor**

U tekućinskoj kromatografiji izbor odgovarajućeg detektora ovisi o prirodi uzorka. Kao detektori koriste se spektroskopski detektori, detektori fluorescencije, detektori indeksa loma i elektrokemijski detektori. Detektori mogu pratiti značajke mobilne faze ili otopljene tvari. U prvom slučaju se mjeri vodljivost ili indeks loma pa je analit odnosno otopljena tvar dokazan indirektno primjenom tih veličina. Dok se u drugom slučaju prate karakteristike otopljene tvari kao što su apsorpcija u UV/Vis ili IR području, fluorescencija ili struja na elektrodi. Najčešće se koriste detektori s diodnim nizom koji omogućuju snimanje cijelog spektra eluiranog sastojka u UV/Vis području (Luterotti, 2012).

1.3. Validacija metode

Validacija analitičke metode je važan proces u kemijsko-analitičkoj praksi te je kvaliteta podataka koji se dobivaju ispitivanom metodom direktno povezana s kvalitetom validacije. Validacija metode je proces kojim se dokazuje da je određena analitička metoda prihvatljiva za svrhu kojoj je namijenjena, odnosno kojom se na temelju laboratorijskog rada ustanovljava da li izvedbene značajke metode zadovoljavaju zahtjeve analitičke primjene. Stoga, proces evaluacije izvedbenih kriterija i potvrda da je metoda pogodna naziva se validacija metode. Parametri koji se najčešće ispituju su granica dokazivanja, granica određivanja, točnost, preciznost, specifičnost i selektivnost, linearnost i područje mjerenja te otpornost (Luterotti i Bicanic, 2009).

1.3.1. Granica dokazivanja

Granica dokazivanja (engl. *limit of detection*, LOD) je najniža koncentracija analita u uzorku koja može biti pouzdano detektirana, ali ne nužno i kvantificirana pod navedenim eksperimentalnim uvjetima. To je važan parametar kada se rade mjerenja na niskoj razini analita, npr. u analizi tragova. Iskazuje se formulom:

$$LOD = \frac{3,3\sigma}{a}$$

gdje je σ standardno odstupanje rezultata odgovarajućeg broja mjerenja signala slijepog uzorka, ostatno standardno odstupanje regresijskog pravca, ili standardno odstupanje y odsječka regresijskog pravca, dok je a nagib kalibracijskog pravca (Luterotti i Bicanic, 2009; Nigović i sur., 2014).

1.3.2. Granica određivanja

Granica određivanja (engl. *limit of quantification*, LOQ) je najniža koncentracija analita u uzorku koja se može odrediti s prihvatljivom preciznošću i ispravnošću u određenim eksperimentalnim uvjetima te se postavlja kao najniža koncentracija standarda korištenog u validaciji. Iskazuje se formulom:

$$LOQ = \frac{10\sigma}{a}$$

gdje je σ standardno odstupanje rezultata odgovarajućeg broja mjerenja signala slijepog uzorka, ostatno standardno odstupanje regresijskog pravca, ili standardno odstupanje y odsječka regresijskog pravca, dok je a nagib kalibracijskog pravca (Luterotti i Bicanic, 2009; Nigović i sur., 2014).

1.3.3. Točnost

Točnost analitičke metode je blizina rezultata dobivenih ispitivanom metodom odnosno izmjerenih vrijednosti i stvarne vrijednosti uzorka. Za utvrđivanje točnosti provode se najmanje tri mjerenja uzorka za najmanje tri koncentracije u radnom području metode. Odstupanje od stvarne vrijednosti najčešće se iskazuje kao analitički prinos (engl. *Recovery*)

$$R = \frac{x}{x_{stvarno}} \times 100$$

gdje je x srednja izmjerena vrijednost, a $x_{stvarno}$ stvarna vrijednost analita u uzorku (Luterotti i Bicanic, 2009; Nigović i sur., 2014).

1.3.4. Preciznost

Preciznost analitičke metode je stupanj podudaranja pojedinačnih neovisnih rezultata ispitivanja kada se postupak ponavlja na višestrukim uzorcima dobivenim iz jednog cjelovitog homogenog uzorka. Preciznost pokazuje koliko dobro metoda funkcionira kod ponovljene primjene. Kako bi se ispitala preciznost provodi se pet do šest mjerenja na dvije do tri različite koncentracije. Preciznost se može iskazati kao ponovljivost, srednja preciznost i obnovljivost. Ponovljivost je podudaranje rezultata dobivenih istom metodom pod istim uvjetima u kratkom vremenskom intervalu. Srednja preciznost je odstupanje rezultata dobivenih u istom laboratoriju, ali pod različitim uvjetima (različiti analitičar, različiti instrument) kroz duži vremenski period, dok obnovljivost označava odstupanje rezultata dobivenih u različitim laboratorijima.

Najčešće se izražava kao relativno standardno odstupanje (engl. *relative standard deviation*, RSD) te se izražava kao %:

$$RSD = \frac{SD}{X} \times 100$$

pri čemu je *SD* standardna devijacija, a *X* srednja vrijednost dobivenih rezultata (Luterotti i Bicanic, 2009; Nigović i sur., 2014).

1.3.5. Specifičnost i selektivnost

Specifičnost metode je sposobnost da se ispravno i specifično izmjeri analit u prisustvu sastavnica uzorka, odnosno sposobnost metode da izmjeri samo ono za što je namijenjena da izmjeri. Selektivnost metode je mogućnost metode da točno odredi željeni analit u prisutnosti ostalih komponenata uzorka, poput onečišćenja, razgradnih produkata i pomoćnih tvari (Luterotti i Bicanic, 2009; Nigović i sur., 2014).

1.3.6. Linearnost i područje mjerenja

Linearnost analitičke metode je sposobnost da se izraze rezultati ispitivanja koji su linearno proporcionalni koncentraciji analita u uzroku u datom koncentracijskom području. Ispitivanje linearnosti potvrđuje da su otopine uzorka u koncentracijskom području u kojemu

je odgovor analita linearno proporcionalan koncentraciji analita. Linearnost metode utvrđuje se kroz tri do šest mjerenja primjenom najmanje pet različitih koncentracija analita. Ovisnost izmjerenog analitičkog signala o koncentraciji analita grafički se prikazuje pomoću kalibracijskog pravca. Linearnost metode izražava se koeficijentom korelacije regresijskog pravca pri čemu mora vrijediti $R^2 \leq 1,0$. Područje mjerenja označava raspon između gornje i donje koncentracije analita u uzorku, uključujući i granične vrijednosti, unutar kojega primjenjena analitička metoda ima zadovoljavajuću točnost, preciznost i linearnost (Luterotti i Bicanic, 2009; Nigović i sur., 2014).

1.3.7. Otpornost

Otpornost analitičke metode je mjera njenog kapaciteta da ostane nenarušena malim, ali namjernim varijacijama parametara metode (npr. sastav mobilne faze ili pH, temperatura kolone i injektirani volumen). Indikator je pouzdanosti analitičke metode tijekom njezine normalne primjene uz male promjene uvjeta u kojima se realno provode analize. Prosuđuje se variranjem jednog parametra, dok ostali ostaju nepromijenjeni, a izbor parametara za ispitivanje otpornosti ovisi o samoj metodi (Luterotti i Bicanic, 2009; Nigović i sur., 2014).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Vinska kiselina je mala organska kiselina čije soli se nazivaju tartaratima. U obliku kalijevog tartarata vinsku kiselinu nalazimo u biljkama, prvenstveno grožđu, bananama i tamarindu. Vinska kiselina izolirana je još 800. godine, a koristila se i u antici. Modernim putem izolirana je 1769. godine iz tzv. vinskog kamena, taloga koji se može naći na dnu posuda u kojima se čuva vino.

Vinska kiselina najviše se primjenjuje u prehrambenoj industriji, primjerice u pekarstvu i u proizvodnji vina. Smatra se bezopasnom za ljudsko zdravlje te je dozvoljena njena primjena kao aditiva. Ima E broj E334. Ipak neka istraživanja pokazuju da bi visoke količine vinske kiseline mogle imati štetan učinak na ljudsko zdravlje. Stoga je važno kontrolirati razinu vinske kiseline u namirnicama koje su namijenjene za ljudsku prehranu. To prvenstveno vrijedi za voćne sokove koji imaju vinsku kiselinu prirodno prisutnu u voću kao i onu koja je dodana prilikom proizvodnje kao stabilizator i pojačivač okusa.

Cilj ovoga istraživanja bio je uvesti analitičku metodu koja će pouzdano u uzorcima komercijalno pribavljenih voćnih sokova odrediti koncentraciju vinske kiseline. Za određivanje koncentracije vinske kiseline korišten je HPLC obrnute faze s UV/Vis detektorom. Metoda je validirana tako što su pripremljeni standardi vinske kiseline koji su služili za izradu kalibracijskog pravca, određivanja preciznosti (ponovljivosti) te LOD i LOQ razvijene metode. Nakon što je validirana, metoda je ispitana na uzorcima komercijalno pribavljenih voćnih sokova.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Kemikalije

3.1.1. Korištene kemikalije:

- metanol, CH₃OH, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- standard vinske kiseline, Sigma Chemical Co, St. Louis, SAD
- ortofosforna kiselina, o-H₃PO₄, min. 85 %, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- kalijev dihidrogenfosfat, KH₂PO₄, Kemika, Zagreb, Hrvatska

Sve navedene korištene kemikalije bile su *p.a.* čistoće, dok je metanol koji je upotrebljen za kondicioniranje HPLC uređaja bio HPLC čistoće. Za pripremu otopina korištena je MilliQ voda.

3.2. Aparatura

3.2.1. Upotrebljena aparatura:

- analitička vaga, Acculab, Sartorius group, Bradford, SAD
- HPLC uređaj, Knauer, Berlin, Njemačka
- pH metar, MP220, Mettler Toledo, Švicarska
- ultrazvučna kupelj, Transsonic T570, Elma, Singen, Njemačka

3.2.2. Dijelovi korištenog HPLC-a:

- izokratna pumpa (model 64, Knauer, Berlin, Njemačka)
- UV/Vis detektor (model UV-1, Knauer, Berlin, Njemačka)
- softver Eurochrom 2000 Software (Knauer, Berlin, Njemačka)
- manualni injektor (Rheodyne 7010) s petljom volumena 100 µL
- analitička kolona, obrnute faze, C18, dimenzija 125,0 x 4,6 mm s punilom veličine 5 µm (LiChrospher RP-18, Merck, Darmstadt, Njemačka)

3.2.3. Uvjeti na HPLC-u

Kao mobilna faza korištena je 50 mM otopina fosfatnog pufera pH 2,8. Protok mobilne faze bio je podešen na 0,5 mL/min te je tako stvoren tlak od 16,7 MPa. Volumen injektiranja standardnih otopina vinske kiseline i otopina uzoraka bio je 50 µL. Iz razloga što

je korišten injektor s petljom volumena 100 μ L važno je vrlo pažljivo unošenje uzorka u petlju.

Na početku i na kraju rada s HPLC uređajem, HPLC uređaj je kondicioniran, a za kondicioniranje uređaja korištena je 50 %-tna otopina metanola. I 50 %-tna otopina metanola, i mobilna faza, prije korištenja na HPLC uređaju prethodno su stavljene u ultrazvučnu kupelj da bi se uklonio višak otopljenog zraka, a koji bi mogao oštetiti analitičku kolonu.

Valna duljina detekcije na UV/Vis detektoru bila je podešena na 214 nm.

Kontrola samog procesa HPLC analize i obrada dobivenih rezultata s UV/Vis detektora provedena je pomoću softvera Eurochrom 2000 Software.

3.3. Uzorci

Kao uzorci korišteni su različiti voćni sokovi ($n = 5$) pribavljeni u obližnjoj trgovini. Jedan uzorak je bio sok od limuna te dva soka od jabuke i dva soka od naranče. Sokovi su bili od različitih proizvođača. Uzorci sokova čuvani su u zamrzivaču na $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ do pripreme za analizu.

3.4. Određivanje koncentracije vinske kiseline pomoću HPLC-a

3.4.1. Priprema otopina

Mobilna faza

Kao mobilna faza korištena je 50 mM otopina fosfatnog pufera čiji pH je bio 2,8. Iz molekularne mase KH_2PO_4 ($M=136,09$) izračunato je da je potrebno otopiti 6,8 g KH_2PO_4 u 1,0 L MilliQ vode. Zatim je odvaga 6,8 g KH_2PO_4 kvantitativno prenesena u odmjernu tikvicu volumena 500 mL te do oznake nadopunjena s MilliQ vodom. Nakon što se KH_2PO_4 otopio u MilliQ vodi, otopini je podešen pH na 2,8 dodatkom 85 %-tne o- H_3PO_4 te je otopina zatim bila nadopunjena s MilliQ vodom do volumena od 1,0 L. Takav kiseli pH mobilne faze potreban je iz razloga da vinska kiselina ostane u protoniranom obliku kako bi se ostvarile najbolje interakcije s C18 stacionarnom fazom analitičke kolone (Kowalski i Wittrig, 2007). Prije nego što je bila korištena, mobilna faza je bila stavljena u ultrazvučnu kupelj kako bi se uklonio višak otopljenog zraka.

Matična otopina standarda vinske kiseline

Matična otopina standarda vinske kiseline pripremljena je otapanjem 200 mg komercijalno pribavljene vinske kiseline u 100 mL MilliQ vode. Koncentracija osnovne matične otopine iznosila je 2,0 g/L.

Standardne otopine vinske kiseline

Iz osnovne matične otopine vinske kiseline pripremljen je niz standardnih otopina vinske kiseline u koncentracijskom rasponu od 0,125 do 1,0 g/L. Standardne otopine vinske kiseline pripremljene su razrjeđivanjem s MilliQ vodom. U tablici 1 prikazan je postupak razrjeđivanja. Tako pripremljene standardne otopine injektirane su u HPLC uređaj.

Tablica 1. Koncentracije i postupak izrade standardnih otopina vinske kiseline

Koncentracija standardne otopine vinske kiseline (g/L)	Postupak pripreme standardnih otopina vinske kiseline	Ukupno razrjeđenje u odnosu na matičnu otopinu
1,0	5 mL matične otopine standarda vinske kiseline koncentracije 2,0 g/L nadopunjeno do 10 mL s MilliQ vodom	2 x
0,5	5 mL standardne otopine vinske kiseline koncentracije 1,0 g/L nadopunjeno do 10 mL s MilliQ vodom	4 x
0,25	5 mL standardne otopine vinske kiseline koncentracije 0,5 g/L nadopunjeno do 10 mL s MilliQ vodom	8 x
0,125	5 mL standardne otopine vinske kiseline koncentracije 0,25 g/L nadopunjeno do 10 mL s MilliQ vodom	16 x

3.4.2. Priprema uzoraka

Voćni sokovi (n=5) za HPLC analizu pripremljeni su razrjeđivanjem s deioniziranom vodom u volumnom omjeru 1 : 9. U tablici 2 navedeni su ispitivani uzorci i postupak razrjeđenja. Tako razrijeđeni uzorci injektirani su u HPLC uređaj.

Tablica 2. Uzorci voćnih sokova i postupak pripreme za HPLC analizu

Uzorci voćnih sokova	Postupak razrjeđenja deioniziranom vodom
1. sok od naranče; uzorak 1	1 mL uzorka soka nadopunjeno do 10 mL deioniziranom vodom
2. sok od jabuke; uzorak 2	1 mL uzorka soka nadopunjeno do 10 mL deioniziranom vodom
3. sok od jabuke; uzorak 3	1 mL uzorka soka nadopunjeno do 10 mL deioniziranom vodom
4. sok od naranče; uzorak 4	1 mL uzorka soka nadopunjeno do 10 mL deioniziranom vodom
5. sok od limuna; uzorak 5	1 mL uzorka soka nadopunjeno do 10 mL deioniziranom vodom

4. REZULTATI I RASPRAVA

Zbog široke primjene vinske kiseline u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji te prilikom proizvodnje vina, ljudi su često izloženi proizvodima sa sadržajem vinske kiseline. U uvodnom dijelu navedena je povezanost vinske kiseline s ljudskim zdravljem odnosno mogući štetni učinci vinske kiseline u visokim koncentracijama na ljudsko zdravlje. Iz navedenih razloga važno je pratiti koncentraciju vinske kiseline u raznim proizvodima kako bi se spriječilo predoziranje vinskom kiselinom te mogući razvoj bolesti.

Za kvalitativno i kvantitativno određivanje vinske kiseline u raznim uzorcima koriste se spektrofotometrijske i kromatografske metode. Za određivanje koncentracije vinske kiseline najkorištenija metoda je HPLC. HPLC metodom se povećava osjetljivost i selektivnost zbog razdvajanja komponenti uzorka na kromatografskoj koloni pa je zbog toga u prednosti u odnosu na spektrofotometrijske metode. Kao metoda izbora za određivanje koncentracije vinske kiseline u voćnim sokovima u ovome istraživanju korištena je HPLC metoda.

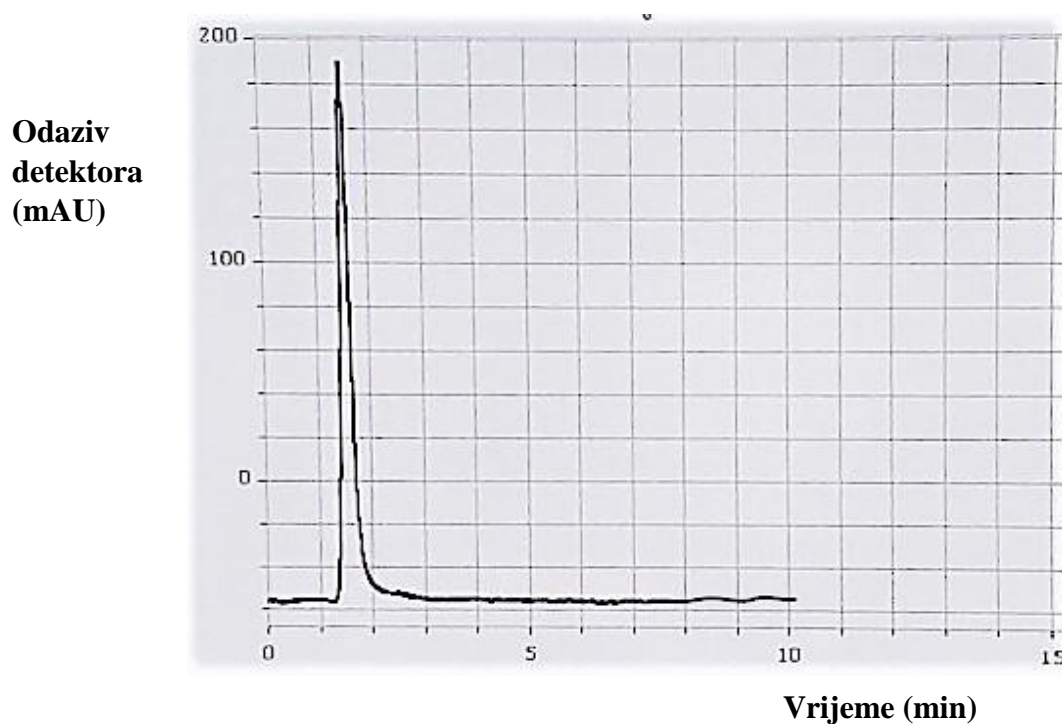
4.1. Uvođenje metode za određivanje vinske kiseline na HPLC s UV/Vis detektorom

Za određivanje koncentracije vinske kiseline u voćnim sokovima u ovome istraživanju bila je korištena HPLC metoda obrnute faze s UV/Vis detektorom. Prema literaturnim podacima valna duljina detekcije vinske kiseline pomoću UV/Vis detektora je u rasponu od 210 nm do 226 nm, a u ovome istraživanju UV/Vis detektor bio je podešen na 214 nm (Kowalski i Wittrig, 2007; Scherer i sur., 2012).

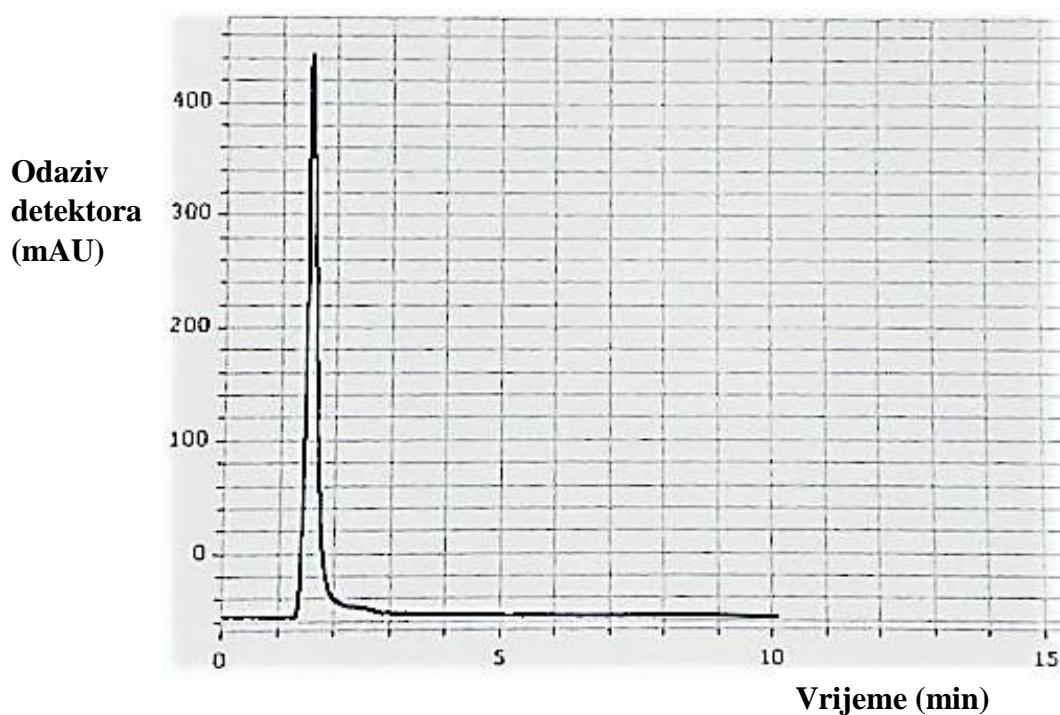
Korištena mobilna faza je bila 50 mM otopina fosfatnog pufera pH 2,8 pripravljena kako je navedeno u poglavlju Materijali i metode. Kako je vinska kiselina slaba organska kiselina male molarne mase ($M = 150,09 \text{ g/mol}$) i ima polarne skupine, potrebna je 100 % vodena mobilna faza kako bi se postiglo odgovarajuće zadržavanje na koloni. pH mobilne faze bio je podešen na 2,8 kako bi vinska kiselina ostala protonirana ili neutralna i tako ostvarila najbolju interakciju s C18 stacionarnom fazom kromatografske kolone (Kowalski i Wittrig, 2007). Kada se kao mobilna faza koristi 100 %-tna vodena otopina kiselog pH, ona može dovesti do razdvajanja ugljikovodičnih lanaca stacionarne faze i kolapsa kromatografske kolone te tako onemogućiti zadržavanje supstancija na koloni. No, analize provedene u ovome istraživanju pokazale su da je korištena mobilna faza prikladna. Protok mobilne faze u ovome istraživanju je bio podešen na 0,5 mL/min što je stvaralo tlak od 16,7 MPa.

U navedenim analitičkim uvjetima: kolona obrnute faze C18, dimenzija 125,0 x 4,6 mm i veličina punila 5 μm , valna duljina detektora 214 nm i mobilna faza 50 mM fosfatni pufer pH 2,8, protok 0,5 ml/min dobiven je zadovoljavajući kromatogram osnovne (bazne) linije, odnosno bez interferencija.

Na slikama 6 i 7 prikazani su kromatogrami standardnih otopina vinske kiseline koncentracija 0,5 g/L i 1,0 g/L koji su dobiveni pri navedenim uvjetima mjerenja. Iz prikazanih kromatograma vidi se da je vrijeme zadržavanja vinske kiseline na koloni iznosilo oko 1,5 minute, a ukupna analiza je trajala 10 minuta. Na temelju vremena zadržavanja vinske kiseline na koloni (1,5 minuta) i ukupne analize (10 minuta) može se zaključiti da je uvedena HPLC-UV/Vis metoda za određivanje koncentracije vinske kiseline brza.



Slika 6. Kromatogram standardne otopine vinske kiseline koncentracije 0,5 g/L dobiven na HPLC s UV/Vis detektorom



Slika 7. Kromatogram standardne otopine vinske kiseline koncentracije 1,0 g/L dobiven na HPLC s UV/Vis detektorom

4.2. Validacija metode za određivanje vinske kiseline na HPLC s UV/Vis detektorom

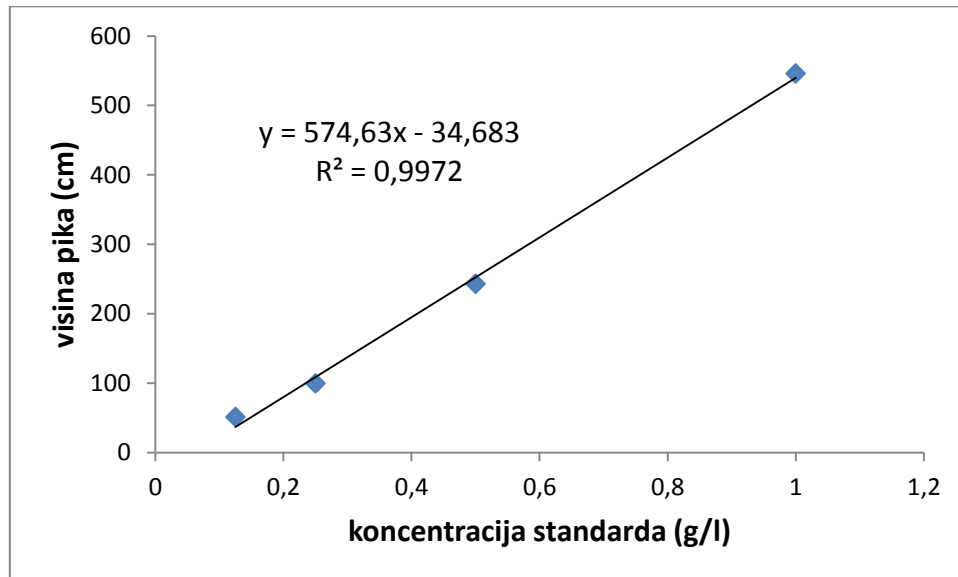
Validacija analitičke metode je važan proces u kemijsko-analitičkoj praksi te je kvaliteta podataka koji se dobivaju ispitivanom metodom direktno povezana s kvalitetom validacije. Validacija metode je proces kojim se dokazuje da je određena analitička metoda prihvatljiva za svrhu kojoj je namijenjena, odnosno kojom se na temelju laboratorijskog rada ustanovljava da li izvedbene značajke metode zadovoljavaju zahtjeve analitičke primjene (Luterotti i Bicanic, 2009).

Prilikom uvođenja metode za određivanje vinske kiseline u voćnim sokovima, metoda je validirana. Za validaciju metode su korištene standardne otopine vinske kiseline u koncentracijskom rasponu od 0,125 do 1,0 g/L. Način pripreme standardnih otopina vinske kiseline opisana je u poglavlju Materijali i metode. U svrhu validacije metode ispitani su validacijski parametri: linearnost, preciznost (ponovljivost), granica dokazivanja i granica određivanja.

4.2.1. Linearnost

Linearnost analitičke metode je sposobnost da se izraze rezultati ispitivanja koji su linearno proporcionalni koncentraciji analita u uzroku u datom koncentracijskom području. Ispitivanje linearnosti potvrđuje da su otopine uzorka u koncentracijskom području u kojemu je odgovor analita linearno proporcionalan koncentraciji analita. Linearnost metode izražava se koeficijentom korelacije regresijskog pravca pri čemu mora vrijediti $R^2 \leq 1,0$ (Luterotti i Bicanic, 2009; Nigović i sur., 2014).

Prilikom izrade kalibracijskog pravca i provjere linearnosti metode napravljen je niz mjerenja standardnih otopina vinske kiseline u koncentracijskom rasponu od 0,125 do 1,0 g/L. Svaka od standardnih otopina analizirana je najmanje pet puta te je iz tih mjerenja izračunata srednja vrijednost visine analitičkog signala. Iz ovisnosti srednje vrijednosti visine analitičkog signala i poznate koncentracije standarda vinske kiseline konstruiran je kalibracijski pravac (slika 8). Zatim je regresijskom analizom dobivena jednačba kalibracijskog pravca $y = 574,63x - 34,683$ s pripadajućim koeficijentom korelacije $R^2 = 0,9972$.



Slika 8. Kalibracijski pravac standardnih otopina vinske kiseline u koncentracijskom rasponu 0,125 – 1,0 g/L analiziranih pomoću HPLC s UV/Vis detektorom

Iz dobivene jednadžbe pravca i koeficijenta korelacije može se zaključiti da je metoda u koncentracijskom rasponu 0,125 – 1,0 g/L linearna te se može upotrijebiti za analizu koncentracije vinske kiseline.

4.2.2. Preciznost

Preciznost analitičke metode je stupanj podudaranja pojedinačnih neovisnih rezultata ispitivanja kada se postupak ponavlja na višestrukim uzorcima dobivenim iz jednog cjelovitog homogenog uzorka. Preciznost pokazuje koliko dobro metoda funkcionira kod ponovljene primjene. Kako bi se ispitala preciznost provodi se pet do šest mjerenja na dvije do tri različite koncentracije. Najčešće se izražava kao RSD. Preciznost se može iskazati kao ponovljivost, srednja preciznost i obnovljivost (Luterotti i Bicanic, 2009; Nigović i sur., 2014).

Kod ovog istraživanja za određivanje ponovljivosti korištene su standardne otopine vinske kiseline u koncentracijskom rasponu 0,125 do 1,0 g/L koje su uzastopno (5 do 6) puta injektirane u HPLC sustav s UV/Vis detektorom. Zatim je iz dobivenih vrijednosti izračunat RSD. U tablici 3 prikazani su rezultati ispitivanja ponovljivosti standarda vinske kiseline koncentracije 0,5 g/L.

Tablica 3. Izmjerene visine pikova standarda vinske kiseline koncentracije 0,5 g/L u kratkom vremenskom intervalu (ispitivanje ponovljivosti)

Standard koncentracije 0,5 g/L	Visina pika (mAU)
1. mjerenje	240,046
2. mjerenje	252,444
3. mjerenje	245,372
4. mjerenje	239,224
5. mjerenje	237,306
6. mjerenje	242,052
Srednja vrijednost visine pika (X)	242,741
Standardna devijacija (SD)	5,4902938
Relativna standardna devijacija RSD (%)	2,26

Na identičan način izračunate su RSD vrijednosti za preostale standardne otopine vinske kiseline. U tablici 4 navedene su RSD vrijednosti za preostale tri koncentracije standardnih otopina vinske kiseline.

Tablica 4. Preciznost u seriji dobivena ispitivanjem standardnih otopina vinske kiseline koncentracija 0,125 g/L, 0,25 g/L i 1,0 g/L

Koncentracija standarda vinske kiseline (g/L)	RSD (%)
0,125	3,77
0,25	5,65
1,0	7,27

S obzirom da su vrijednosti RSD dobivene ispitivanjem preciznosti manje od 10 %, može se zaključiti da će uvedena metoda relativno precizno odrediti koncentraciju vinske kiseline u nepoznatom uzorku.

4.2.3. Granica dokazivanja i granica određivanja

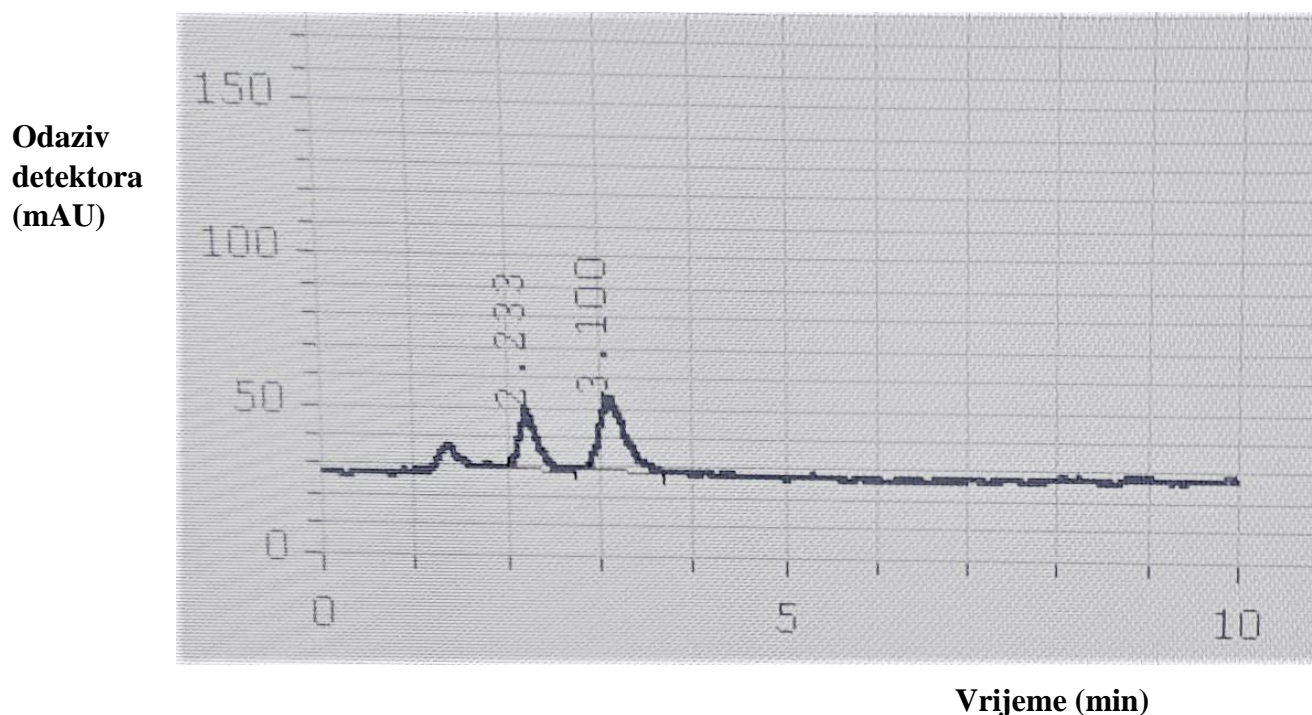
Granica dokazivanja (LOD) je najniža koncentracija analita u uzorku koja može biti pouzdano detektirana, ali ne nužno i kvantificirana, a granica određivanja (LOQ) je najniža koncentracija analita u uzorku koja se može odrediti s prihvatljivom preciznošću i ispravnošću (Luterotti i Bicanic, 2009). Izrazi prema kojima se navedeni parametri izračunavaju navedeni su u poglavlju Uvod.

LOD i LOQ su izračunati iz nagiba kalibracijske krivulje. Granica dokazivanja iznosi 0,01 g/L, a granica određivanja 0,03 g/L. Dobiveni rezultati prikazuju da je metoda dovoljno osjetljiva te da može u nepoznatom uzorku pouzdano odrediti koncentraciju vinske kiseline od 0,03 g/L.

4.3. Ispitivanje HPLC-UV/Vis metode za određivanje koncentracije vinske kiseline na uzorcima voćnih sokova

Voćni sokovi ($n = 5$) korišteni za analizu bili su pripremljeni na način kako je navedeno u poglavlju Materijali i metode te analizirani pomoću HPLC s UV/Vis detektorom.

Slika 9 prikazuje kromatogram jednog od analiziranih uzoraka voćnoga soka. Na prikazanom kromatogramu vidljiva su tri analitička signala (pika) pa je detekcija vinske kiseline napravljena usporedbom s kromatogramom standardne otopine vinske kiseline. Na temelju već utvrđenog vremena zadržavanja vinske kiseline iz kromatograma standardnih otopina (oko 1,5 minuta), može se zaključiti da je prvi, najmanji pik na kromatogramu uzorka voćnog soka, pik vinske kiseline.



Slika 9. Kromatogram jednog od uzoraka voćnog soka dobiven na HPLC s UV/Vis detektorom

Koncentracija vinske kiseline u voćnim sokovima određena je pomoću prethodno dobivene jednadžbe kalibracijske krivulje, a rezultati su prikazani u tablici 5.

Tablica 5. Visina pikova i koncentracija vinske kiseline u uzorcima voćnih sokova analiziranih na HPLC s UV/Vis detektorom

Uzorci voćnih sokova	Visina pika (mAU)	Koncentracija vinske kiseline u analiziranim razrijeđenim uzorcima (g/L)	Koncentracija vinske kiseline u voćnim sokovima (g/L)
1. sok od naranče; uzorak 1	31,1	0,115	1,15
2. sok od jabuke; uzorak 2	34,4	0,120	1,20
3. sok od jabuke; uzorak 3	54,0	0,154	1,54
4. sok od naranče; uzorak 4	38,5	0,127	1,27
5. sok od limuna; uzorak 5	37,1	0,125	1,25

U svim ispitivanim uzorcima voćnoga soka potvrđeno je prisustvo vinske kiseline. Vinska kiselina utvrđena je u koncentracijskom rasponu od 1,15 g/L (sok od naranče; uzorak 1) do 1,54 g/L (sok od jabuke; uzorak 3).

Ispitivani voćni sokovi na svojim deklaracijama nemaju navedenu količinu vinske kiseline koju sadrže, stoga ne možemo dobivene rezultate usporediti s onima koji su navedene. Unatoč tome u Republici Hrvatskoj postoje pravilnici koji reguliraju područje prehrambenih aditiva kao što je pravilnik o prehrambenim aditivima NN 62/2010, s izmjenama i dopunama pravilnika NN 62/2011, 135/2011 i 79/2012. Navedeni pravilnici u potpunosti su usklađeni s pravilnicima Europske Unije koji reguliraju područje prehrambenih aditiva (Uredba komisije EU br. 1129/2011). U ovim pravilnicima propisana je upotreba

vinske kiseline *quantum satis* što označava da nije određena najviša numerička vrijednost i da se aditiv upotrebljava u skladu s dobrom proizvođačkom praksom (DPP) u količini koja nije viša od nužne za postizanje svrhe.

S obzirom da najveća dopuštena koncentracija vinske kiseline u voćnim sokovima nije precizno definirana, nije moguće usporediti rezultate dobivene HPLC analizom, ali može se zaključiti da su rezultati dobiveni analizom u skladu s dobrom proizvođačkom praksom. Takav zaključak je donesen na temelju rezultata dobivenih analizom, a to su koncentracije u rasponu od 1,15 g/L do 1,54 g/L pri čemu je vidljivo da se radi od relativno bliskim i niskim koncentracijama vinske kiseline u voćnim sokovima.

Uvedena metoda pokazala se primjenjivom za precizno i pouzdano određivanje koncentracije vinske kiseline u voćnim sokovima.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se donijeti sljedeći zaključci:

- uvedena i validirana HPLC-UV/Vis metoda omogućuje precizno, pouzdano i brzo određivanje koncentracije vinske kiseline u voćnim sokovima
- u svim ispitivanim uzorcima komercijalno pribavljenih voćnih sokova koncentracija vinske kiseline je bila relativno niska i u skladu s dobrom proizvođačkom praksom, što znači da je količina vinske kiseline u uzorcima prihvatljiva za svakodnevnu upotrebu i bezopasna za ljudsko zdravlje ukoliko se voćni sokovi primjenjuju u umjerenim količinama.

6. LITERATURA

Abdelhamid D, Zhang Y, Lewis DR, Moghe PV, Welsh WJ, Uhrich KE. Tartaric acid-based amphiphilic macromolecules with ether linkages exhibit enhanced repression of oxidized low density lipoprotein uptake. *Biomaterials*, 2015, 53, 32-39.

Bižić N. Pretok i bistenje vina, <http://www.vinogradarstvo.hr>, pristupljeno 6.10.2017.

Christian GD. Chromatography: Principles and Theory. U: Analytical chemistry, 6th edition. Westford, Matrix Publishing Services, 2004, str. 555-573.

DeBolt S, Cook DR, Ford CM. L-Tartaric acid synthesis from vitamin C in higher plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(14), 5608-5613.

Elsbury WB, Browne RC, Boyes J. Erosion of teeth due to tartaric acid dust. *Br J Ind Med*, 1951, 8(3), 179-180.

Foodchem; Applicatios and uses of L-Tartaric acid, <https://www.foodchemadditives.com>, pristupljeno 13.10.2017.

Hrvatska enciklopedija; Vinska kiselina, <http://www.enciklopedija.hr>, pristupljeno 10.10.2017.

Kowalski J, Wittrig B. Simple, Reliable HPLC Analyses of Organic Acids Using Water-Compatible Allure or Ultra C18 Columns, 2007, <http://www.restek.com>, pristupljeno 12.10.2017.

Luterotti S. Uvod u kemijsku analizu, Postupci odjeljivanja, Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2012, str. 202-224.

Luterotti S, Bicanic D. Odabrane teme iz bioanalitike, Validacija bioanalitičkih metoda, Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2009, str 1-18.

Melino VJ, Soole KL, Ford CM. Ascorbate metabolism and the developmental demand for tartaric and oxalic acids in ripening grape berries. *BMC Plant Biol*, 2009, 9, 145.

Naqvi R. Acute kidney injury from different poisonous substances. *World J Nephrol*, 2017, 6(3), 162-167.

Nigović B, Jurišić Grubešić R, Vuković Rodriguez J, Mornar Turk A, Sertić M. Analitika lijekova – praktikum, Validacija analitičkog postupka, Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2014, str. 135-138.

- Noller CR. Kemija organskih spojeva. Zagreb, Tehnička knjiga, 1973, str. 212, 334, 809.
- Pravilnik o prehrambenim aditivima, 2010, Zagreb, Narodne novine, broj 62 (NN/62/10)
- Pubchem; Tartaric Acid, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, pristupljeno 5.10.2017.
- Rusyniak DE, Durant PJ, Mowry JB, Johnson JA, Sanftleben JA, Smith JM. Life-Threatening Hyperkalemia from ream of Tartar Ingestion. *J Med Toxicol*, 2012, 9, 79-81.
- Scherer R, Poloni Rybka AC, Ballus CA, Dillenburg Meinhart A, Teixeira Filho Teixeira Godoy H. Validation of a HPLC method for simultaneous determination of main organic acids in fruits and juices. *Food Chemistry*, 2012, 135, 150-154.
- Skoog DA, West DM, Holler FJ. Fundamentals of analytical chemistry, 6th edition. Prevoditelji: Kujundžić N, Živčić-Alegretti V, Živković A. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, Zagreb, Školska knjiga, 1999, str. 693-700.
- Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR. High-Performance Liquid Chromatography U: Fundamentals of analytical chemistry, 8th edition. Belmont, Brooks/Cole Publishing, 2004, str. 973-974.
- Štraus B, Stavljenić-Rukavina A, Plavšić F, i sur. Analitičke tehnike u kliničkom laboratoriju. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, Zagreb, Medicinska naklada, 1997, str. 246-252.
- Uredba komisije (EU) br. 1129/2011 o izmjeni Priloga II. Uredbi (EZ) br. 1333/2008 Europskog parlamenta i Vijeća o popisu Unije prehrambenih aditiva, 2011, Službeni list Europske Unije, L 295/1
- Wessely K, Zech K. HPLC in Pharmaceutical Analysis. Gmbh Boblingen, Hewlett-Packard 1979, str. 50-55.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Cilj ovoga istraživanja je bio uvesti analitičku metodu koja bi omogućila precizno, pouzdano i brzo određivanje koncentracije vinske kiseline u uzorcima komercijalno pribavljenih voćnih sokova. Prilikom određivanja koncentracije vinske kiseline korištena je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) s UV/Vis detektorom. Istraživanje je bilo provedeno na HPLC (Knauer, Berlin, Njemačka) koji se sastojao od UV/Vis detektora, manualnog injektora, izokratne pumpe i analitičke kolone obrnute faze dimenzija 125,0 x 4,6 mm s punilom veličine 5 μ m (LiChrospher RP-18, Merck, Darmstadt, Njemačka). Valna duljina detekcije na UV/Vis detektoru bila je podešena na 214 nm. Mobilna faza bila je 50 mM otopina fosfatnog pufera pH 2,8. Protok mobilne faze bio je podešen na 0,5 mL/min što je stvaralo tlak od 16,7 MPa. Iz osnovne matične otopine vinske kiseline (2,0 g/L) razrjeđenjem s MilliQ vodom pripremljen je niz standardnih otopina vinske kiseline u koncentracijskom rasponu od 0,125 do 1,0 g/L. Pri opisanim uvjetima na HPLC-UV/Vis vrijeme zadržavanja vinske kiseline na koloni iznosilo je oko 1,5 minute, a ukupna analiza trajala je 10 minuta. Dobivena kalibracijska krivulja je bila pravac s jednadžbom pravca $y = 574,63x - 34,683$ i pripadajućim koeficijentom korelacije $R^2 = 0,9972$. Ponovljivost izražena kao relativna standardna devijacija (RSD) iznosila je manje od 10 % za sve ispitane standardne otopine. Granica dokazivanja bila je 0,01 g/L, a granica određivanja 0,03 g/L, što pokazuje da je metoda vrlo osjetljiva. Mjerenjem koncentracije vinske kiseline u komercijalno pribavljenim uzorcima voćnog soka ($n = 5$) dobivene su vrijednosti u rasponu od 1,15 g/L (sok od naranče; uzorak 1) do 1,54 g/L (sok od jabuke; uzorak 3). Dobivene koncentracije vinske kiseline u voćnim sokovima su bile relativno niske i bezopasne za ljudsko zdravlje. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je razvijena metoda brza, pouzdana i precizna te se može koristiti za određivanje koncentracije vinske kiseline u uzorcima voćnih sokova. Zbog negativnog utjecaja visokih razina vinske kiseline na ljudsko zdravlje, važno je pratiti njenu koncentraciju u proizvodima namijenjenima konzumaciji ljudi.

The aim of this research was to introduce an analytical method that would allow precise, reliable and fast determination of tartaric acid concentration in samples of commercially obtained fruit juices. To determine the concentration of tartaric acid, high performance liquid chromatography (HPLC) with UV/Vis detector was used. This research was conducted on HPLC (Knauer, Berlin, Germany) consisted of UV/Vis detector, manual injector, isocratic pump and reverse phase analytical column (dimension: 125.0 x 4.6 mm, particle size: 5 μ m; LiChrospher RP-18, Merck, Darmstadt, Germany). Wavelength on the UV/Vis detector was set at 214 nm. The mobile phase was 50 mM phosphate buffer with pH adjusted to 2.8. The mobile phase flow was 0.5 mL/min and the resulting pressure 16.7 MPa. From the tartaric acid stock solution (2.0 g/L) by diluting with MilliQ water a set of working standards solutions was prepared in a concentration range of 0.125 to 1.0 g/L. In described HPLC conditions, the tartaric acid retention time was approximately 1.5 minutes and the analysis lasted 10 minutes. Calibration curve was linear (equation: $y = 574.63x - 34.683$; correlation factor: $R^2 = 0.9972$). Repeatability expressed as relative standard deviation (RSD) was less than 10 % for all tested working standard solutions. The limit of detection was 0.01 g/L and the limit of quantification was 0.03 g/L, indicating that developed method is very sensitive. The concentration of tartaric acid in commercially provided fruit juice samples (n = 5) ranged from 1.15 g/L (orange juice, sample 1) to 1.54 g/L (apple juice, sample 3). The obtained concentrations of tartaric acid in fruit juices were relatively low and harmless to human health. From the results it can be concluded that the developed method is fast, reliable and accurate and can be used to determine the concentration of tartaric acid in fruit juices. Due to the negative impact of high levels of tartaric acid on human health, it is important to monitor its concentration in products intended for human consumption.

8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmaceutsku botaniku
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Optimiziranje metode za određivanje koncentracije vinske kiseline u voćnim sokovima

Omar Kaoudahhan

SAŽETAK

Cilj ovoga istraživanja je bio uvesti analitičku metodu koja bi omogućila precizno, pouzdano i brzo određivanje koncentracije vinske kiseline u uzorcima komercijalno pribavljenih voćnih sokova. Prilikom određivanja koncentracije vinske kiseline korištena je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) s UV/Vis detektorom. Istraživanje je bilo provedeno na HPLC (Knauer, Berlin, Njemačka) koji se sastojao od UV/Vis detektora, manualnog injektora, izokratne pumpe i analitičke kolone obrnute faze dimenzija 125,0 x 4,6 mm s punilom veličine 5 μ m (LiChrospher RP-18, Merck, Darmstadt, Njemačka). Valna duljina detekcije na UV/Vis detektoru bila je podešena na 214 nm. Mobilna faza bila je 50 mM otopina fosfatnog pufera pH 2,8. Protok mobilne faze bio je podešen na 0,5 mL/min što je stvaralo tlak od 16,7 MPa. Iz osnovne matične otopine vinske kiseline (2,0 g/L) razrjeđenjem s MilliQ vodom pripremljen je niz standardnih otopina vinske kiseline u koncentracijskom rasponu od 0,125 do 1,0 g/L. Pri opisanim uvjetima na HPLC-UV/Vis vrijeme zadržavanja vinske kiseline na koloni iznosilo je oko 1,5 minute, a ukupna analiza trajala je 10 minuta. Dobivena kalibracijska krivulja je bila pravac s jednadžbom pravca $y = 574,63x - 34,683$ i pripadajućim koeficijentom korelacije $R^2 = 0,9972$. Ponovljivost izražena kao relativna standardna devijacija (RSD) iznosila je manje od 10 % za sve ispitane standardne otopine. Granica dokazivanja bila je 0,01 g/L, a granica određivanja 0,03 g/L, što pokazuje da je metoda vrlo osjetljiva. Mjerenjem koncentracije vinske kiseline u komercijalno pribavljenim uzorcima voćnog soka ($n = 5$) dobivene su vrijednosti u rasponu od 1,15 g/L (sok od naranče; uzorak 1) do 1,54 g/L (sok od jabuke; uzorak 3). Dobivene koncentracije vinske kiseline u voćnim sokovima su bile relativno niske i bezopasne za ljudsko zdravlje. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je razvijena metoda brza, pouzdana i precizna te se može koristiti za određivanje koncentracije vinske kiseline u uzorcima voćnih sokova. Zbog negativnog utjecaja visokih razina vinske kiseline na ljudsko zdravlje, važno je pratiti njenu koncentraciju u proizvodima namijenjenima konzumaciji ljudi.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 38 stranica, 9 grafičkih prikaza, 5 tablica i 23 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Vinska kiselina, voćni sokovi, HPLC, validacija, optimiziranje, Uredba komisije EU br. 1129/2011

Mentor: **Dr. sc. Ana-Marija Domijan**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ana-Marija Domijan**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Mirela Matić, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Suzana Inić, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: studeni 2017.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutical Botany
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Development of the method for determination of tartaric acid in fruit juices

Omar Kaoudahhan

SUMMARY

The aim of this research was to introduce an analytical method that would allow precise, reliable and fast determination of tartaric acid concentration in samples of commercially obtained fruit juices. To determine the concentration of tartaric acid, high performance liquid chromatography (HPLC) with UV/Vis detector was used. This research was conducted on HPLC (Knauer, Berlin, Germany) consisted of UV/Vis detector, manual injector, isocratic pump and reverse phase analytical column (dimension: 125.0 x 4.6 mm, particle size: 5 µm; LiChrospher RP-18, Merck, Darmstadt, Germany). Wavelength on the UV/Vis detector was set at 214 nm. The mobile phase was 50 mM phosphate buffer with pH adjusted to 2.8. The mobile phase flow was 0.5 mL/min and the resulting pressure 16.7 MPa. From the tartaric acid stock solution (2.0 g/L) by diluting with MilliQ water a set of working standards solutions was prepared in a concentration range of 0.125 to 1.0 g/L. In described HPLC conditions, the tartaric acid retention time was approximately 1.5 minutes and the analysis lasted 10 minutes. Calibration curve was linear (equation: $y = 574.63x - 34.683$; correlation factor: $R^2 = 0.9972$). Repeatability expressed as relative standard deviation (RSD) was less than 10 % for all tested working standard solutions. The limit of detection was 0.01 g/L and the limit of quantification was 0.03 g/L, indicating that developed method is very sensitive. The concentration of tartaric acid in commercially provided fruit juice samples ($n = 5$) ranged from 1.15 g/L (orange juice, sample 1) to 1.54 g/L (apple juice, sample 3). The obtained concentrations of tartaric acid in fruit juices were relatively low and harmless to human health. From the results it can be concluded that the developed method is fast, reliable and accurate and can be used to determine the concentration of tartaric acid in fruit juices. Due to the negative impact of high levels of tartaric acid on human health, it is important to monitor its concentration in products intended for human consumption.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 38 pages, 9 figures, 5 tables and 23 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Tartaric acid, fruit juices, HPLC, validation, optimization, Commission regulation EU No. 1129/2011

Mentor: **Ana-Marija Domijan, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ana-Marija Domijan, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Mirela Matić, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Suzana Inić, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: November 2017.